

İyatrojenik İmmünoşüpresif ve İmmünokompetan Hastalarda *Pneumocystis jirovecii* Pnömonisi ve Kolonizasyonunun Araştırılması

Investigation of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia and Colonization in Iatrogenically Immunosuppressed and Immunocompetent Patients

Soykan ÖZKOÇ¹, Songül BAYRAM DELİBAŞ¹

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Izmir Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 26.01.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 16.03.2015

ÖZ

Pneumocystis pnömonisi (PCP), immün sistem bozukluğu olan hastalarda ölümcül seyredabilen bir akciğer enfeksiyonudur. Bununla birlikte *Pneumocystis jirovecii*'nin sağlıklı kişilerde ve diğer kronik akciğer hastalarında kolonize olabildiği bilinmektedir. Bu çalışmada, immün sistemi normal ve iyatrojenik olarak baskılanmış hastaların, PCP ve *P.jirovecii* kolonizasyonu yönünden değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ocak 2011-Nisan 2014 tarihleri arasında farklı pulmoner semptomları nedeniyle bronkoskopi yapılan toplam 92 hasta (66 erkek, 26 kadın; yaş aralığı: 18-93 yıl, ortanca: 58.5) dahil edilmiştir. Hastaların 65'i immünoşüpresif ilaç (38'i anti-kanser, 15'i anti-rejeksiyon/immünomodülatör ve 12'si kortikosteroid) tedavisi alan, 27'si ise almayan olgulardır. Hastalara ait bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı örnekleri *P.jirovecii* ribozomal RNA büyük alt ünitesini kodlayan mitokondriyal geni (mtLSUrRNA) çoğaltan iki türlü (nested) PCR (nPCR) yöntemi ile değerlendirilmiş; ayrıca tüm örnekler Giemsa ve Gomori'nin metenamin gümüş (GMG) boyama yöntemiyle boyanarak incelenmiştir. Çalışmada, nPCR ile 92 BAL örneğinin 31 (%33.7)'inde *P.jirovecii* DNA'sı saptanmıştır. Birinci PCR aşamasında, immünoşüpresif altı (%6.4) hasta pozitif iken, nPCR ile immünoşüpresif 65 hastanın 26 (%40)'sı ve immünokompetan 27 hastanın beşi (%18.5) pozitif bulunmuştur. nPCR ile pozitif saptanan 31 örneğin sadece beşinde (%16.1) Giemsa ve GMG boyaları ile *P.jirovecii* kist ve trofozoitleri gözlenmiştir. nPCR pozitif olguların immünoşüpresif olma olasılığı, nPCR negatif hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuş ($\chi^2= 3.940$; $p= 0.047$); bu farkın organ transplant alıcıları ve anti-rejeksiyon/immünomodülatör ilaç tedavisi alan hastalarda daha belirgin olduğu (sırasıyla, $\chi^2= 6.715$, $p= 0.01$; $\chi^2= 5.550$, $p= 0.018$) izlenmiştir. nPCR pozitif saptanan hastalar klinik, laboratuvar ve radyolojik olarak incelendiğinde; immünoşüpresif grupta yer alan beş (2 böbrek transplantı, 1 kemik iliği transplantı, 1 akciğer kanseri ve 1 interstiyel

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Soykan Özkoç, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 412 4541, **E-posta (E-mail):** soykan.ozkoc@deu.edu.tr

akciğer hastalığı olan) hasta "kesin PCP" ve sekiz (2 böbrek transplantı, 1 lösemi, 1 bağı dokusu hastalığı, 1 Wegener granüloatozu, 2 romatoid artrit ve 1 akciğer kanseri olan) hasta "olası PCP" olgusu olarak değerlendirilmiştir. nPCR ile pozitif bulunan diğer 13 immünoşüpresif ve beş immünokompetan olmak üzere toplam 18 (%19.6) hasta ise "*P.jirovecii* kolonizasyonu" olarak kabul edilmiştir. İmmünoşüpresif hastalarda kolonizasyon oranı %50 (13/26) olarak saptanmış; kolonizasyon en sık hematolojik malignitesi olan hastalarda (4/13) görülmüş, bunu solid tümörler (3/13) ve organ transplantasyonları (3/13) izlenmiştir. Buna karşın *P.jirovecii* pozitif olan immünokompetan hastaların tümü (5/5) kolonizasyon olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, ülkemizdeki *P.jirovecii* epidemiyolojisi hakkında önemli veriler elde edilmiştir. Verilerimiz, iyatrojenik immün şüpresyonu olan hastaların PCP gelişimi açısından risk altında olduğunu göstermekte ve bu tip hastaların tanısında nPCR yönteminin, konvansiyonel PCR ve klasik boyama yöntemlerinden daha duyarlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar sözcükler: *Pneumocystis pnömonisi; Pneumocystis jirovecii; nested PCR; kolonizasyon; immünoşüpresyon.*

ABSTRACT

Pneumocystis pneumonia (PCP) is a potentially life-threatening infection for the immunocompromized patients. However, *Pneumocystis jirovecii* colonization can also be detected in healthy individuals and in patients with various underlying lung diseases. The aim of this study was to evaluate the immunocompetent and iatrogenically immunosuppressed patients in terms of PCP and *P.jirovecii* colonization. A total of 92 patients (66 male, 26 female; age range: 18-93 years, median: 58.5) who underwent bronchoscopy due to various pulmonary symptoms between January 2011-April 2014, were included in the study. Of these patients, 65 were under immunosuppressive therapy (38 were treated with anti-cancer drugs, 15 with anti-rejection/immunomodulatory drugs and 12 with corticosteroids), while 27 were immunocompetent. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluids were evaluated for the presence of *P.jirovecii* mitochondrial gene coding ribosomal large subunit (mtLSURrRNA) with nested PCR (nPCR) method. All of the samples were also examined by Giemsa and Gomori's methenamine silver (GMG) staining methods. *P.jirovecii* DNA was detected in 31 (33.7%) out of 92 BAL samples by nPCR. Although six immunosuppressed patients were positive in the first round of amplification, 26 of 65 (40%) immunosuppressed and five of 27 (18.5%) immunocompetent patients were positive with nPCR. *P.jirovecii* cysts and trophozoites were detected in only five (16.1%) of the 31 nPCR positive samples. The probability of being immunosuppressive among nPCR positive cases was statistically higher than nPCR negative cases ($\chi^2= 3.940$; $p= 0.047$). This difference was more significant in organ transplant recipients and patients under anti-rejection/immunomodulatory treatment ($\chi^2= 6.715$, $p= 0.01$; $\chi^2= 5.550$, $p= 0.018$, respectively). When clinical, laboratory and radiological findings of nPCR positive patients were considered, five patients (2 kidney transplant, 1 bone marrow transplant, 1 interstitial lung disease and 1 lung cancer case) in immunosuppressed group were interpreted as "definite PCP" and eight patients (2 kidney transplant, 1 leukemia, 1 connective tissue disease, 1 Wegener's granulomatosis, 2 rheumatoid arthritis and 1 lung cancer case) were interpreted as "probable PCP". Other 18 (19.6%) nPCR positive patients, of them 13 were immunosuppressive and five were immunocompetent, were considered as "*P.jirovecii* colonization". The colonization rate was determined as 50% (13/26) in immunosuppressive patients, and was mostly detected in patients with hematological malignancies (4/13), followed by patients with solid tumors (3/13) and organ transplantations (3/13). On the other hand, all of the nPCR positive immunocompetent patients (5/5) were evaluated as colonization. In this study significant data was obtained about *P.jirovecii* epidemiology in our country. Our results also showed that iatrogenically immunosuppressed patients are under risk of PCP and nPCR method is more sensitive than conventional PCR and classical staining methods in the diagnosis of these patients.

Keywords: *Pneumocystis pneumonia; Pneumocystis jirovecii; nested PCR; colonization; immunosuppression.*

GİRİŞ

Pneumocystis jirovecii pnömonisi (PCP), immün sistemi baskılanmış hastalarda ölümcül olabilen fırsatçı enfeksiyonlar arasında yer almaktadır^{1,2}. Son zamanlarda hematolojik ve solid organ tümörleri, organ transplantasyonları ve otoimmün hastalıklarda etkili immünoşüpresif tedavilerin kullanıma girmesiyle, HIV negatif immünoşüpresif hastalardaki PCP enfeksiyonlarında artış gözlenmektedir^{3,4}. Ateş, kuru öksürük ve dispne gibi özgül olmayan semptomlar ile başlayan PCP, AIDS dışı immünoşüpresif hastalarda daha agresif seyretmekte ve %35-55 oranlarında mortaliteye neden olmaktadır⁴⁻⁶.

P.jirovecii kültürde üretilemediğinden, etkenin solunum sistemi örneklerinde mikroskopik olarak saptanması tanıda altın standarttır¹. Bununla birlikte AIDS dışı immünoşüpresif hastalarda gözlenen PCP'de parazit yükünün çoğu zaman düşük olması, mikroskopik tanının duyarlılığını azaltmaktadır^{4,7}. Günümüzde bu sorun PCR temelli yöntemlerin kullanıma girmesiyle önemli ölçüde aşılmış durumdadır^{2,8}. Ancak klinik örneklerde *P.jirovecii*'nin veya DNA'sının saptanması mutlaka enfeksiyon anlamına gelmemektedir. Klinik olarak semptom vermeyen kişilerde, organizmanın veya DNA'sının tespit edilmesi kolonizasyon olarak tanımlanmıştır^{7,9}. Bu nedenle mikroskopisi negatif, ancak PCR pozitif bulunan hastalarda enfeksiyonun tanısı ve tedavisi için klinik değerlendirme oldukça önemlidir. Risk altındaki hastaların belirlenmesi ve uygun profilaktik tedavinin uygulanması ile PCP enfeksiyonlarının sıklığı azaltılabilmektedir^{10,11}. Gelişmekte olan ülkelerde ise enfeksiyon epidemiyolojisi hakkında yeterli bilginin olmaması, tanısal araçların eksikliği ve yetersiz yoğun bakım şartları, özellikle ağır immün süpresyonu olan hastalarda enfeksiyonun tanısını ve yönetimini zorlaştırmaktadır^{11,12}. Bu konuda ülkemizde yapılan az sayıda çalışmanın olduğu ve bunların *P.jirovecii* epidemiyolojisi ile ilgili sınırlı düzeyde bilgi sağladığı görülmektedir¹³⁻¹⁷. Bu nedenle çalışmamızda, bronkoskopi yapılan hastalardaki olası *P.jirovecii* pozitifliklerini ortaya koyarak, PCP ve kolonizasyon yönünden değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar ve Örnekler

Çalışmaya, Ocak 2011-Nisan 2014 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi (DEÜH)'nde farklı pulmoner semptomları nedeniyle bronkoskopi yapılmış 92 hasta dahil edildi. Bunların 65'i iyatrojenik olarak immün sistemi baskılanmış hastalardı. Diğer 27 hasta ise bronkoskopi yapıldığı dönemde herhangi bir immünoşüpresif tedavi almıyordu. Hastalardan elde edilen bronkoalveolar lavaj (BAL) örnekleri, DEÜH Merkez Parazitoloji Laboratuvarında boyama yöntemleri ve DNA ekstraksiyonu için iki kısma ayrıldı. Hastaların dosyaları incelenerek altta yatan hastalıkları, radyolojik özellikleri, aldıkları tedaviler, yaş ve cinsiyet özellikleri kaydedildi. Çalışma için gerekli etik onay DEÜ Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'ndan (Karar no: 2014/23-04) alındı.

Mikroskopik tanı

Sitantrifüj yöntemiyle her bir boyama yöntemi için iki adet preparat hazırlandı. Lamlar havada kurutulduktan ve metanol ile 5 dakika fikse edildikten sonra Giemsa ve

Gomori'nin metenamin gümüş boyama (GMG) yöntemleri uygulandı. Kistleri saptamaya yönelik uygulanan GMG yöntemi üretici firma (Bio Optica, İtalya) prosedürlerine göre çalışıldı. Giemsa ve GMG boyalı preparatlar ışık mikroskopunda 1000x büyütmede değerlendirildi.

DNA Ekstraksiyonu ve İki Turlu PCR Yöntemi

BAL örnekleri 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen pelletin 200 µl'si DNA ekstraksiyonu için kullanıldı¹⁸. DNA ekstraksiyon kiti (Macherey-Nagel, Almanya) ile üretici firma prosedürlerine göre elde edilen DNA örnekleri, amplifikasyon işlemi yapıncaya kadar -20°C'de saklandı. Negatif kontrol olarak saf (ultrapure) distile su kullanılırken, pozitif kontrol olarak daha önce PCP tanısı almış hastanın örnekleri kullanıldı¹⁹.

İki turlu PCR (nested-PCR; nPCR) yönteminde *P.jirovecii* mtLSURRNA gen bölgesi hedeflendi. Birinci PCR döngüsünde pAZ102-E (5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3') ve pAZ102-H (5'GTGTACGTTGCAAAGTA CTC-3') primerleri; ikinci PCR döngüsünde ise pAZ102-X (5'-GTGAAATACAAATCGGACTA GG-3') ve pAZ102-Y (5'-TCACTTAATATTA-ATTGGGGAGC-3) primerleri kullanıldı¹⁸. Her bir reaksiyon için 2.5 µl 10x reaksiyon tamponu, 2.5 µl MgCl₂ (25 mM stok), 2.5 µl dNTP (2 mM stok), 1 µl Taq DNA polimeraz (1 U/µl stok), 0.75 µl primer (10 µM stok) ve 1 µl DNA örneği eklendikten sonra steril distile su ile son hacim 25 µl'ye tamamlandı. Amplifikasyon, 94°C'de 5 dakikalık ön denatürasyonun ardından 40 döngü; 94°C'de 1 dakika, 56°C'de 1 dakika, 72°C'de 1.5 dakika ve son uzama basamağı için 72°C'de 5 dakika olacak şekilde düzenlendi¹⁸. Her iki döngü için aynı miktar ve süreler uygulandı. Reaksiyon sonunda 10 µl PCR ürünü, %1.5'lik agaroz jelde 100 volt altında 40 dakika elektroforeze tabi tutulduktan sonra 1 µg/ml etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık altında görüntüldü. Birinci PCR döngüsü sonunda 346 baz çifti (bç), nPCR sonunda ise 267 bç uzunluğunda ampikon saptanması durumunda örnekler pozitif olarak değerlendirildi¹⁸. Tüm PCR testleri her bir örnek için üç kez tekrar edildi.

P.jirovecii nPCR Pozitif Hastaların Klinik Sınıflandırması

PCP tanısı için uluslararası bir standart bulunmadığından, nPCR sonucu pozitif saptanan hastaların olgu tanımı, Maillet ve arkadaşlarının²⁰ kullandığı şu kriterlere göre yapıldı:

1. Mikroskopik olarak *P.jirovecii* kist ve/veya trofozoitlerinin saptanması,
2. Ani başlangıçlı ateş, prodüktif olmayan öksürük ve dispne şikayetinin olması,
3. Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografide yaygın buzlu cam opasitelerinin olması,
4. Anti-PCP tedavisine yanıt alınması veya tedavi almayan hastaların eksitus olması.

Dosya bilgilerine göre kriterlerin tümünü karşılayanlar "kesin PCP" hastası; mikroskopik tanı dışındaki tüm kriterleri karşılayanlar ise "olası PCP" hastası olarak kabul edildi. nPCR pozitif saptanan ancak tipik PCP klinik ve radyolojik bulguları olmayan veya başka bir etiyolojik etken saptanan ve bu etkene karşı uygulanan tedaviyle klinik bulguları düzelenler "kolonizasyon" olarak değerlendirildi²⁰.

İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 15.0 programı ile yapıldı. *P.jirovecii* DNA'sı pozitif saptanan ve saptanmayan hastalar arasındaki prevalans farkını karşılaştırmak için χ^2 testi; her iki grup arasındaki demografik ve klinik verilerin karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U ve Fisher's Exact testleri kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

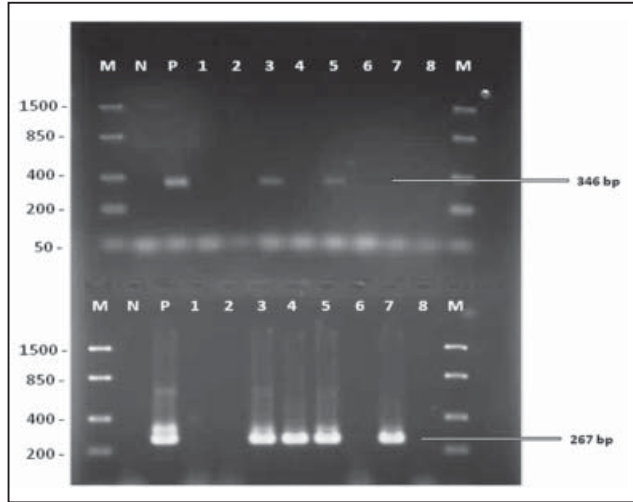
BULGULAR

Çalışmaya alınan 92 hastanın 66 (%72)'sı erkek ve 26 (%28)'sı kadın olup, yaş aralığı 18-93 (ortanca: 58.5) yıl arasında değişmektedir. İyatrojenik olarak immüno-supresif 65 hastanın 25'i hematolojik malignite, 13'ü solid organ tümörü, 12'si organ transplantasyonu (tx), 9'u inflamatuvar/otoimmün hastalık (İ/OİH) ve 6'sı kronik akciğer hastalığı nedeniyle tedavi altındadır. Bu hastaların 38'i anti-kanser, 15'i anti-rejeksiyon/immüno-modülatör (azotiyoprin, siklosporin, mikofenolat mofetil, metotreksat, TNF- α inhibitörü, vb) ve 12'si yalnızca kortikosteroid (> 20 mg/gün) tedavisi almaktadır. İmmüno-supresif ilaç almayan hastaların 6'sı kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), 5'i akciğer kanseri (Akc-Ca) ve 16'sı farklı hastalık tanıları almıştır (Tablo I).

İki türlü PCR ile 92 BAL örneğinin 31 (%33.7)'inde *P.jirovecii* DNA'sı saptanırken, birinci PCR döngüsü sonucunda sadece immüno-supresif 6 (%6.5) hastanın örneği pozitif bulunmuştur (Şekil 1). Giemsa ve GMG ile boyama sonucunda birinci amplifikasyon döngüsü ile pozitif saptanan hastaların 5 (%6.5)'i dışında hiçbir hastada parazit kist ve trofozoitlerine rastlanmamıştır.

İmmüno-supresif hastaların 26 (%40)'sı nPCR ile pozitif bulunmuştur. En yüksek nPCR pozitifliği, organ transplantasyon alıcılarında (%66.7) gözlenmiştir. İmmünokompetan olguların ise 5 (%18.5)'inde pozitiflik saptanmıştır. Hasta gruplarının nPCR sonuçları Tablo I' de özetlenmiştir.

PCR pozitif hastalardan, immüno-supresif gruptaki 5 hasta [2 böbrek tx; 1 Akc-Ca; 1 interstisyel akciğer hastalığı (İAH); 1 kemik iliği tx] "kesin PCP"; 8 hasta [2 böbrek tx; 1 lösemi; 1 bağ dokusu hastalığı (BDH); 1 Wegener granülomatuzu (WG); 2 romatoid artrit



Şekil 1. *P.jirovecii* mtLSUrRNA genine ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. [Üst sıra: Birinci PCR döngüsü amplifikasyon ürünleri (PAZ102-E ve PAZ102-H primerleri ile); N: Negatif kontrol; P: Pozitif kontrol; Hat 3 ve 5: Pozitif saptanan hastalar; Hat 1, 2, 4, 6, 7 ve 8: Negatif saptanan hastalar. Alt sıra: nPCR ürünleri (PAZ102-X ve PAZ102-Y primerleri ile); N: Negatif kontrol; P: Pozitif kontrol; Hat 3, 4, 5 ve 7: Pozitif saptanan hastalar; Hat 1, 2, 6 ve 8: Negatif saptanan hastalar]

Tablo 1. Farklı Hastalık Grubundaki Hastaların Sıklıkları ve Her Bir Gruptaki nPCR Sonuçları

Hastalık grubu (Hasta sayısı)	nPCR pozitif n (%)	Kesin/olası PCP n (%)	<i>P. jirovecii</i> kolonizasyonu n (%)
İmmünoşüpresif tedavi alan (65)	26 (40)	13 (50)	13 (50)
Hematolojik maligniteler (25)	5 (20)	1 (20)	4 (80)
Lösemi (11)	3	1	2
Lenfoma (11)	1	0	1
Multiple myeloma (3)	1	0	1
Solid organ maligniteleri (13)	5 (38.4)	2 (40)	3 (60)
Akciğer kanseri (10)	4	2	2
Diğer (meme, larinks, vb) (3)	1	0	1
Organ transplantasyonu (tx) (12)	8 (66.7)	5 (62.5)	3 (37.5)
Böbrek tx (8)	6	4	2
Karaciğer tx (3)	1	0	1
Kemik iliği tx (1)	1	1	0
İnflamatuvar hastalıklar/vaskülitler (9)	5 (55.5)	4 (80)	1 (20)
Romatoid artrit (3)	2	2	0
Wegener granülomatozu (4)	2	1	1
Bağ dokusu hastalığı (2)	1	1	0
Diğer akciğer hastalıkları (6)	3 (50)	1 (33)	2 (66)
KOAH (4)	2	0	2
İAH (2)	1	1	0
İmmünoşüpresif tedavi almayan (27)	5 (18.5)	0	5 (100)
KOAH (6)	3	0	3
Akciğer kanseri (5)	0	0	0
Diğer* (16)	2 **	0	2 **

* Bakteriyel pnömoni (n= 9), viral-fungal pnömoni (n= 3), tüberküloz (n= 2), tanımlanamayan (n= 2).
** Akciğer kanseri şüphesi sonrası negatif saptanan hasta ve bakteriyel pnömoni saptanan demyelinizan polinöropatili hasta.
KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı; İAH: İnterstiyel akciğer hastalığı

(RA); 1 Akc-Ca] "olası PCP" olgusu olarak değerlendirilmiştir. Her iki gruptan toplam 18 (%19.6) hasta "*P.jirovecii* kolonizasyonu" olarak kabul edilmiştir (Tablo 1).

PCR pozitif ve negatif hastalar karşılaştırıldığında *P.jirovecii* pozitifliğinin yaşa ve cinsiyete bağımlı olmadığı saptanmıştır. *P.jirovecii* nPCR pozitif olguların immünoşüpresif olma olasılığı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($\chi^2= 3.940$; $p= 0.047$). Aynı şekilde, organ transplant alıcılarında ve anti-rejeksiyon/immünomodülatör tedavi alan hastalardaki nPCR pozitif saptanma oranları, negatif saptanma oranlarına göre is-

Tablo II. Hastaların Klinik ve Demografik Özellikleri

	<i>P. jirovecii</i> nPCR		P değeri
	Pozitif (n= 31)	Negatif (n= 61)	
Ortanca yaş (yaş aralığı, yıl)	57 (22-28)	60 (18-93)	0.086
Erkek cinsiyet, n (%)	20 (64.5)	46 (75.4)	0.273
KOAH, n (%)	5 (16.1)	5 (8.2)	0.248
Hematolojik malignite, n (%)	5 (16.1)	20 (32.8)	0.090
Solid organ tümörü, n (%)	5 (16.1)	13 (21.3)	0.554
Organ transplantasyonu, n (%)	8 (25.8)	4 (6.6)	0.01*
İnflamatuvar/otoimmün hastalıklar, n (%)	5 (16.1)	4 (6.6)	0.144
İmmün süpresyon/yetmezlik, n (%)	26 (83.9)	39 (63.9)	0.047*
Sadece kortikosteroid kullanımı (>20 mg/gün), n (%)	5 (16.1)	7 (11.5)	0.531
Kemoterapi/radyoterapi, n (%)	12 (38.7)	26 (42.6)	0.718
Anti-rejeksiyon/immünomodülatör tedavi, n (%)	9 (29)	6 (9.8)	0.018*

* p< 0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlıdır.

tatistiksel olarak yüksektir ($\chi^2= 6.715$, p= 0.01; $\chi^2= 5.550$, p= 0.018). Pozitif ve negatif saptanan hastaların klinik ve demografik özellikleri Tablo II’de karşılaştırılmıştır.

TARTIŞMA

Pneumocystis jirovecii ile ilgili ülkemizde yapılmış az sayıda çalışmada %8-24 arasında pozitiflik bildirilmiştir¹³⁻¹⁷. Döşkaya ve arkadaşları¹⁴, PCP şüphesi olan 69 hastaya ait 76 örneğin %24’ünde gerçek zamanlı PCR ile *P.jirovecii* pozitifliği tespit etmişler; Tekinşen ve arkadaşları¹⁵ ise nPCR ile immüno-süpresif 100 hastanın sadece %8’inde pozitiflik saptadıklarını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, çoğu (~%71) immün sistemi baskılanmış hastalardan oluşan 92 olgunun BAL örneğinde %33.7 gibi yüksek bir oranda *P.jirovecii* pozitifliği belirlenmiştir.

HIV negatif immüno-süpresif hastalarda *P.jirovecii* yükünün çoğu zaman düşük olması, konvansiyonel boya yöntemlerinin tanıdaki duyarlılığını azaltmaktadır⁴. Bu nedenle PCP kliniği bulunan bu tür hastaların tanısında genellikle PCR tabanlı moleküler yöntemler tercih edilmektedir⁸. Bizim çalışmamızda da, *P.jirovecii* varlığının saptanması için mtLSUrR-NA genine yönelik nPCR yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada klasik boyama yöntemleriyle sadece beş hastanın örneğinde etken varlığı gösterilebilirken, bu sayı birinci PCR dön-güsü sonunda altı, nPCR sonunda da 31 olarak bulunmuştur. Bu sonuç, klasik boyama yöntemleriyle saptanamayan olguların tanısında nPCR yönteminin klasik PCR’dan daha duyarlı olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda, nPCR ile pozitif saptanan hastalar aynı zamanda klinik, radyolojik ve mikroskopik olarak da incelenmiştir. İmmüno-süpresif grupta yer alan ve mikroskopisi pozitif saptanan beş hasta “kesin PCP” olgusu olarak değerlendirilmiş; bu hastaların dördü (2 böbrek tx, 1 kemik iliği tx, 1 İAH olgusu) anti-PCP tedavisi ile iyileşirken, akciğer kanseri olan hasta tedaviye rağmen hızla kötüleşmiş ve kaybedilmiştir. Diğer taraftan, boyama yöntemleriyle negatif saptanan hastalardan sekizi “olası PCP” olgusu olarak kabul edilmiştir. Bu hastaların dosyaları incelendiğinde; böbrek tx sonrası pnömoni gelişen iki hasta ile RA ve BDH tanıları hastaların ampirik anti-PCP tedavisine yanıt verdikleri, tedavi

verilmemiş diğer dört hastanın (1 lösemi, 1 WG, 1 RA, 1 Akc-Ca olgusu) ise eksitus olduğu anlaşılmıştır. Bu durum, mikroskopik tanısı konulmadığı için PCP olarak değerlendirilmeyen ve etkene yönelik tedavi verilmeyen hastalarda prognozun kötü olabileceğini düşündürmektedir. Klasik boyama yöntemlerinin yeterli olmadığı bu tip "olası PCP" hastalarında *P.jirovecii* varlığının moleküler yöntemlerle gösterilmesi tedavi kararının verilmesinde etkili olabilir.

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda gözlenen *P.jirovecii* varlığının, immün sistemi sağlam kişilere oranla daha fazla olduğu bilinmektedir^{1,2,8}. Kortikosteroid kullanımı en önemli risk faktörleri arasında gösterilmekle birlikte, yeni nesil immünomodülatör ilaçların kullanıma girmesiyle, özellikle hematolojik malignitelere, organ transplant alıcılarında, inflamatuvar bağ dokusu hastalıklarında yüksek *P.jirovecii* pozitiflikleri bildirilmiştir^{3-5,9,11}. Bu çalışmada da, immünoşüpresif 65 hastanın 26 (%40)'sında nPCR ile pozitiflik saptanırken, bu oran immünokompetan hastalarda %18.5 (5/27) olarak bulunmuştur. En yüksek nPCR pozitiflikleri sırasıyla; organ transplant alıcıları (%66.7), İ/OİH (%55.5), kronik akciğer hastalığı (%50) ve solid organ tümörü (%38.4) olan hastalarda gözlenmiştir. nPCR pozitif ve negatif hastalar kendi aralarında karşılaştırıldığında, *P.jirovecii* pozitif saptanan olguların immünoşüpresif olma olasılığı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir (p= 0.047). Bu farklılık, organ transplant alıcılarında ve anti-rejeksiyon/immünomodülatör ilaç tedavisi alan hastalarda daha belirgindir (p= 0.01; p= 0.018). Çalışmada, literatürde yer alan önceki raporların aksine, tek başına kortikosteroid kullanımı ile *P.jirovecii* pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bu sonuç, monoterapi şeklinde kortikosteroid tedavisi alan sadece 12 hastanın değerlendirilmiş olmasından kaynaklanabilir.

Organ transplant alıcılarındaki PCP enfeksiyonları incelendiğinde, kalp-akciğer transplant hastalarının daha fazla risk altında olduğu görülmektedir⁴. Ancak son yıllarda mikofenolat mofetil gibi yeni anti-rejeksiyon ajanlarının kullanıma girmesiyle böbrek tx yapılan hastalarda salgınlar şeklinde PCP enfeksiyonları rapor edilmiştir^{21,22}. Bizim de, böbrek tx sonrası altı ay profilaksi almasına rağmen PCP gelişen bir olgu raporumuz mevcuttur¹⁹. Sunulan bu çalışmada da, sekiz böbrek transplant alıcısının altısında pozitiflik saptanmış ve bu hastaların dördü "kesin/olası" olgu olarak değerlendirilmiştir. Diğer taraftan kemik iliği tx yapılan bir hasta "kesin PCP" "olarak değerlendirilirken, karaciğer tx yapılan bir hastanın "*P.jirovecii* kolonizasyonu" olduğu düşünülmüştür. Tüm bu sonuçlar, organ transplant alıcılarında gözlenen pnömonilerin ayırıcı tanısında PCP'nin de düşünülmesi gerektiğini göstermektedir.

Çalışmada ilgi çeken diğer bir sonuç, İ/OİH grubundaki dokuz hastanın beşinde *P.jirovecii* pozitifliğinin saptanmasıdır. Yapılan çalışmalarda özellikle düşük doz metotrekstat kullanımının PCP gelişimi açısından risk oluşturduğu bildirilmektedir²³⁻²⁵. Çalışmamızda dönem dönem metotrekstat aldıkları gözlenen RA'li üç hastanın ikisi "olası PCP" olgusu olarak değerlendirilmiştir. nPCR pozitif bulunan diğer üç hastanın ikisi WG, birisi BDH olan hastalardır. Dosya incelemesinde bu hastaların da yüksek doz kortikosteroid aldıkları saptanmıştır. Bu sonuçlar, farklı immünomodülatör ajanların kullanıldığı İ/OİH'da PCP gelişimi açısından dikkatli olunması gerektiğini göstermiştir. Ancak bu grupta sağlıklı veriler elde etmek için daha fazla sayıda hastanın değerlendirilmesi gerekmektedir.

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar, *P.jirovecii* kolonizasyonu saptanan kişilerin, etkenin yayılmasında rezervuar rolü oynayabileceğini, immün süpresyon durumunda ise mevcut

kolonizasyonun PCP gelişim riski oluşturduğunu ortaya koymuştur^{7,10,25}. Çalışmamızda nPCR ile pozitif saptanan 18 (%19.6) hasta "*P.jirovecii* kolonizasyonu" olarak değerlendirilmiştir. Hematolojik malignitelerdeki *P.jirovecii* pozitifliklerinin %80'i kolonizasyon olarak değerlendirilirken, bu oran solid tümörlerde %60, organ transplantasyonlarında %43 ve İ/OİH'da %20 olarak bulunmuştur (Tablo I). Yapılan çalışmalarda, KOAH, İAH, kistik fibrozis ve Akc-Ca gibi kronik akciğer hastalıklarında %2.6-55 arasında *P.jirovecii* kolonizasyonu saptandığı gösterilmiştir²⁶⁻³⁰. Ayrıca bu hastalıkların gelişiminde ve progresyonunda kolonizasyonun etkili olabileceği vurgulanmıştır^{26,27}. Bizim çalışmamızda, kronik akciğer hastalığı olanların %37 (10/27)'sinde *P.jirovecii* DNA pozitifliği saptanmıştır. Henüz tedaviye başlanmayan Akc-Ca hastalarında *P.jirovecii* tespit edilmezken, kemoterapi ve/veya radyoterapi uygulanan 10 hastanın dördünde pozitiflik tespit edilmiş; bu hastaların ikisi kesin/olası PCP, ikisi ise kolonizasyon olarak değerlendirilmiştir. Kortikosteroid tedavisi alan İAH hastası ise "kesin PCP" tanısı almıştır. Diğer taraftan 10 KOAH hastasının beşi kolonizasyon olarak değerlendirilmiş; pozitif saptanan KOAH hastalarından üçünün immünokompetan grupta yer alması, bu tip hastalarda immün süpresyon olmaksızın da *P.jirovecii* kolonizasyonunun olabileceğini vurgulamıştır.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, iyatrojenik immünoşüpresif hastaların PCP gelişimi açısından risk altında olduklarını göstermiştir. Özellikle immünomodülatör ilaç kullanılan organ transplant alıcılarında ve İ/OİH'da gelişen pnömonilerin ayırıcı tanısında mutlaka PCP de düşünülmalıdır. Diğer taraftan, farklı hastalık gruplarındaki *P.jirovecii* kolonizasyonları hakkında veriler elde edilmiştir. Bu gruplarda daha sağlıklı sonuçlara ulaşmak için fazla sayıda hastanın yer aldığı çalışmalar planlanmalıdır. Ayrıca ülkemizdeki genel durumu yansıtmaması açısından tamamen sağlıklı bireylerin yer aldığı epidemiyolojik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Krajicek BJ, Limper AH, Thomas CF. Advances in the biology, pathogenesis and identification of *Pneumocystis pneumonia*. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14(3): 228-34.
2. Lu JJ, Lee CH. *Pneumocystis pneumonia*. *J Formos Med Assoc* 2008; 107(11): 830-42.
3. Bollée G, Miranda S, Azoulay E. *Pneumocystis pneumonia* in non-AIDS immunocompromised patients, pp: 157-70. In: Vincent J-L (ed), *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine* 2007. 2007 edition, Springer-Verlag, Berlin.
4. Tasaka S, Tokuda H. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. *J Infect Chemother* 2012; 18(6): 793-806.
5. Enomoto T, Azuma A, Kohno A, et al. Differences in the clinical characteristics of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients with and without HIV infection. *Respirology* 2010; 15(1):126-31.
6. Tasaka S, Tokuda H. Recent advances in the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected adults. *Expert Opin Med Diagn* 2013; 7(1): 85-97.
7. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25(2): 297-317.
8. Fan LC, Lu HW, Cheng KB, Li HP, Xu JF. Evaluation of PCR in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a bivariate meta-analysis and systematic review. *PLoS One* 2013; 8(9): 73099.
9. Fritzsche C, Riebold D, Munk-Hartig A, Klammt S, Neeck G, Reisinger E. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization among patients with autoimmune inflammatory diseases and corticosteroid therapy. *Scand J Rheumatol* 2012; 41(3): 208-13.

10. Calderon EJ, Dei-Cas E. Pneumocystis infection: unraveling the colonization-to-disease shift. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8(3): 259-62.
11. Cooley L, Dendle C, Wolf J, et al. Consensus guidelines for diagnosis, prophylaxis and management of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological and solid malignancies, 2014. *Intern Med J* 2014; 44(12): 1350-63.
12. de Armas Rodriguez Y, Wissmann G, Müller AL, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in developing countries. *Parasite* 2011; 18(3): 219-28.
13. Güneş I, Kalkancı A, Kuştimur S, Ergüven S, Özet G, Ekim N. Comparison of the methenamine silver staining, direct fluorescent antibody and nested-polymerase chain reaction methods in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38(1-2): 105-12.
14. Döskaya M, Caner A, Degirmenci A, et al. Degree and frequency of inhibition in a routine real-time PCR detecting *Pneumocystis jirovecii* for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in Turkey. *J Med Microbiol* 2011; 60(7): 937-44.
15. Tekinşen FF, Koç AN. Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens by different methods. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(4): 658-67.
16. Tosun I, Buruk K, Dede R, Kaklıkaya N. Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory samples of immunocompromised patients with PCR, IFA and Giemsa staining methods. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(1):195-7.
17. Özmen A, Mistık R, Alver O, Coşkun F, Ursavaş A, Uzaslan E. The *Pneumocystis jirovecii* colonization in bronchoalveolar lavage (BAL) and bronchial washing and the comparison of methods which are used in diagnosis. *Tuberk Toraks* 2013; 61(4): 303-11.
18. Tia T, Putaporntip C, Kosuwin R, Kongpolprom N, Kawkitinarong K, Jongwutiwes S. A highly sensitive novel PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage specimens from immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(6): 598-603.
19. Özkoç S, İnceboz T, Sifil A, Tuncay S, Akisü Ç. *Pneumocystis* pneumonia in a renal transplant recipient. *Türkiye Parazitol Derg* 2010; 34(4): 186-9.
20. Maillet M, Maubon D, Brion JP, et al. *Pneumocystis jirovecii* (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33(3): 331-6.
21. Schmoltdt S, Schuhegger R, Wendler T, et al. Molecular evidence of nosocomial *Pneumocystis jirovecii* transmission among 16 patients after kidney transplantation. *J Clin Microbiol* 2008; 46(3): 966-71.
22. Yazaki H, Goto N, Uchida K, Kobayashi T, Gatanaga H, Oka S. Outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in renal transplant recipients: *P.jirovecii* is contagious to the susceptible host. *Transplantation* 2009; 88(3): 380-5.
23. Mori S, Sugimoto M. *Pneumocystis jirovecii* infection: an emerging threat to patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51(12): 2120-30.
24. Tokuda H, Sakai F, Yamada H, et al. Clinical and radiological features of *Pneumocystis* pneumonia in patients with rheumatoid arthritis, in comparison with methotrexate pneumonitis and *Pneumocystis* pneumonia in acquired immunodeficiency syndrome: a multicenter study. *Intern Med* 2008; 47(10): 915-23.
25. Mekinian A, Durand-Joly I, Hatron PY, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with systemic autoimmune diseases: prevalence, risk factors of colonization and outcome. *Rheumatology (Oxford)* 2011; 50(3): 569-77.
26. Gutiérrez S, Respaldiza N, Campano E, Martínez-Risquez MT, Calderón EJ, De La Horra C. *Pneumocystis jirovecii* colonization in chronic pulmonary disease. *Parasite* 2011; 18(2): 121-6.
27. Calderón EJ. *Pneumocystis* infection: seeing beyond the tip of the iceberg. *Clin Infect Dis* 2010; 50(3): 354-6.
28. Calderón EJ, Rivero L, Respaldiza N, et al. Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis* 2007; 45(2): 17-9.
29. Pederiva MA, Wissmann G, Friaiza V, et al. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. *Med Mycol* 2012; 50(5): 556-60.
30. Vidal S, de la Horra C, Martín J, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonisation in patients with interstitial lung disease. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(3): 231-5.